

Über die Wirkung
von Cocarboxylase, Aneurin, Vitamin B₁₂ und
Pantothensäure auf den durch
Pyrazolone gehemmten Kohlenhydratstoffwechsel
von Leberhomogenat

von

REINHOLD KÜGLE

Aus dem Laboratorium der I. Medizinischen Klinik (Vorstand : Prof. Dr. D. JAHN) der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg.

Über die Wirkung von Cocarboxylase, Aneurin, Vitamin B₁₂ und Pantothensäure auf den durch Pyrazolone gehemmten Kohlenhydratstoffwechsel von Leberhomogenat.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
E r l a n g e n

vorgelegt von

Reinhold K ü g l e

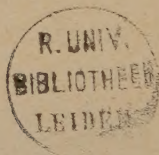
aus R o t h .

23. Dez. 1955

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität E r l a n g e n .

1 9 5 5 .

1.Referent : Prof.Dr.D.JAHN
2.Referent : Prof.Dr.MAY
Dekan : Prof.Dr.KORTH



INHALTSANGABE .

I. Einleitung

II. Methodik und Ergebnisse

- 1) Versuche mit Butazolidin, Aminopyrin, Irgapyrin und Aneurin.
- 2) Versuche mit Butazolidin, Aminopyrin, Irgapyrin und Cocarboxylase.
- 3) Versuche mit Butazolidin, Aminopyrin und Vitamin B₁₂.
- 4) Versuche mit Butazolidin und Pantothensäure.

III. Diskussion

IV. Anhang

L I T E R A T U R .

= = = = =

- 1) Hiller, J. u. Strauss E. : Die Medizinische, in Druck
- 2) Hammerschmidt, O. : Dissertation 1955
- 3) Holzer, H. : Über Fermentkette, 4. Colloquium
d. Gesellschaft f. Phys. Chemie,
17./18. April 1953
- 4) Baer, E. u. Fisher, H. L. : J. Biol. Chem. 150, 213 (1943)
- 5) Lipmann, F. : In: D. E. Green's Currents in Bio-
chemical Research, Interscience
New York, 1946, p. 137.
- 6) Meyerhof, O. : Ann. N. Y. Acad. Sci. 45, 377 (1944)
- 7) Vennesland, B. u.
Felsher, R. Z. : Arch. Biochem. 11, 279 (1946)
Cohen, P. P. : J. Biol. Chem. 164, 685 (1946)
Mee, S. : Arch. Biochem. 22, 139 (1949)
- 8) Lynen, F. : Ann. 1952
- 9) Martin, N. : Z. phys. Chem. 259, 62 (1939)
- 10) Warburg, O. : Erg. Enzymforsch., 7, 210 (1938)

Z U S A M M E N F A S S U N G .

= = = = =

Ausgehend von der Tatsache, dass Pyrazolonderivate (Aminopyrin, Butazolidin und Irgapyrin) den Umsatz von Fruktose und die Oxydation von hydriertem Diphosphoryridinucleotid (DPN-H₂) hemmen, versucht die Arbeit den Ort der Blockade im System der Fermente des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels näher zu ermitteln.

Deswegen wird die Wirkung von Vitamin B₁, Vitamin B₁₂, Cocarboxylase und Pantothensäure auf die beiden gehemmten Systeme untersucht. Es wird gezeigt, dass von dem zugesetzten Proferment, den beiden Vitaminen und der Aminosäure nur Cocarboxylase und Vitamin B₁₂ die Hemmung aufzuheben vermögen.

Die Diskussion stützt sich auf diesen Befund und macht eine Blockade des Fermentsystems, das Phosphat auf Aneurin überträgt (Cocarboxylase), wahrscheinlich.

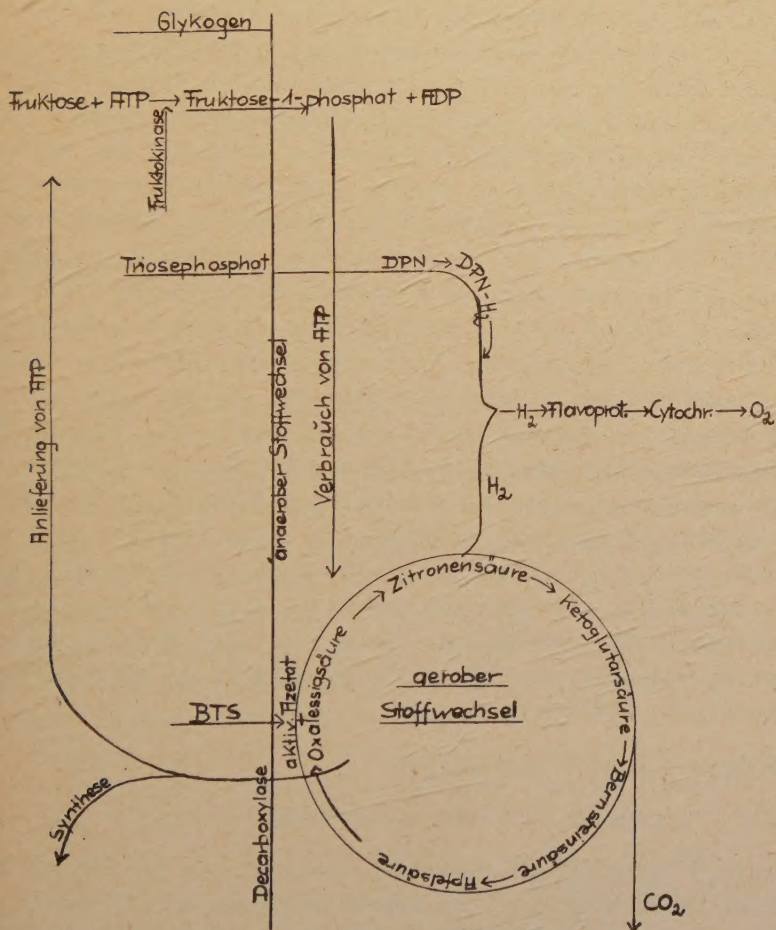
I. E I N L E I T U N G .

= = = = =

In einer aus dem Arbeitskreis der Wissenschaftlichen Abteilung der I. Medizinischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg stammenden Untersuchungsreihe wurde dargetan, dass Pyrazolonderivate den Umsatz von Fruktose sowohl, wie die Oxydation des hydrierten Diphosphopyridinnucleotid durch Leberhomogenate spezifisch hemmen. Die Diskussion der experimentellen Befunde (1,2) lässt aber eine ganze Reihe von Fragen offen. So insbesondere die Frage, wo speziell der Angriffspunkt der Hemmwirkung der Pyrazolone in dem System der fermentativen Kettenreaktionen des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels liegt. Es konnten zwar bestimmte Blockademöglichkeiten wahrscheinlich gemacht werden, doch liess sich der Ort der Blockade nicht mit Sicherheit angeben. Betrachtet man das fermentative System des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels der Leberzelle (des Leberhomogenates) als Einheit, so lässt sich das System am besten durch das in Abbildung 1 gegebene Schema verdeutlichen.

Abbildung 1 .

Schema der wesentlichen Reaktionen des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels .



Aus diesem Schema wird ersichtlich, dass für Hemmwirkungen, die das ganze System des Kohlenhydratstoffwechsels betreffen, vor allem bestimmte zentral gestellte Fermente in Frage kommen. Solche Fermente nehmen eine Schlüsselstellung im Umsatzgeschehen der Fermentkette ein (3). Sie werden durch das System der Kinasen, das System der Brenztraubensäuredecarboxylase (Coccarboxylase) und das System der das DPN-H₂ regenerierenden Flavoproteine dargestellt (4,5). Derartige Schlüsselfermente sind also sowohl im aeroben, wie im anaeroben Abschnitt des Kohlenhydratstoffwechsels zu finden. Wird nun in der damals vorgelegten Untersuchungsreihe die Hemmung des Umsatzes von Fruktose sowohl, wie die Hemmung der Oxydation von hydriertem DPN nachgewiesen, so kann über die Tatsache dieser Hemmung hinaus nicht gesagt werden, wo sich die durch die Pyrazolone verursachten Fermentblockaden befinden. Denn es wird aus dem Schema ohne weiteres verständlich, dass eine Hemmung des Systems an beliebiger Stelle die Hemmung des Umsatzes aller Substrate, die vor dem Ort der Blockade liegen, bewirken muss. Die Minderung der Fähigkeit des Leberhomogenates Fruktose zu phosphorylieren bedeutet also an sich noch nicht, dass das Fruktose phosphorylierende System nämlich das Kinasesystem gehemmt sei. Eine Minderung der Fähigkeit ATP anzubilden, würde z.B. eine ähnliche Umsatzminderung bedeuten, da in die primäre Grundgleichung der Reaktion, nämlich

Fruktose + ATP + Fruktokinase

—————→ Fruktose - 1 - Phosphat + ADP

alle 3 Verbindungen eingehen, wobei abgesehen von dem Katalysator Fruktokinase die Konzentrationen an ATP sowohl, wie an Fruktose ausschlaggebend sind für die letztlich gebildete Menge Fruktose - 1 - Phosphat. Ähnliches gilt für die Regeneration des DPN-H₂ Systems. Prinzipiell wäre möglich,

dass bei rein anaerobem Umsatz die bei der Bildung der Triosephosphate bzw. bei der Umbildung der Triosephosphate zu energiereichem Phosphat benötigte und dem DPN-System entnommene Energie, über den Seitenweg der Milchsäurebildung zurückgewonnen wird, nämlich (6)

1,3-Diphosphoglycerinaldehyd + DPN

—————→ 1,3-Diphosphoglycerinsäure + DPN-H₂2)

und

Brenztraubensäure + DPN-H₂

—————→ Milchsäure + DPN3)

Dieser anaerobe Weg der Rückgewinnung des DPN und damit der Aufrechterhaltung wenigstens des anaeroben Teiles des Umsatzes scheint nach den unter Nr.1-3 vorgelegten Untersuchungsbefunden der oben erwähnten Arbeit nicht beschritten worden zu sein. Es muss also angenommen werden, dass bei Überwiegen des aeroben Umsatzes des dem Substrat zugeführten Zuckers, eine Hemmung stattgefunden hat, die an einer entscheidenden Schlüsselposition der Fermentkette angreift. Das Problem der Substratwirkung der Pyrazolonderivate wird damit auf die Ebene von Fermentantagonismen verschoben. Diese Tatsache ist bereits in den vorhergehenden und zitierten Untersuchungsreihen bewiesen worden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Versuch, den Ort der Blockade einzuengen, d.h., die Wirkung der Pyrazolone auf ein spezifisches Ferment des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels nachzuweisen.

II. METHODIK und ERGEBNISSE .

=====

Die im folgenden aufgeführten Versuche sind mit Leberhomogenat durchgeführt worden. Die Bedingungen der Versuche sind aus dem Anhang zu ersehen.

In einem definiertem Puffersystem (siehe Tabelle I des Anhanges) wurde an durch Butazolidin (3,5-Dioxy-1,2-diphenyl-4-m-butyl-pyrazolidin), Aminopyrin (Dimethylaminoantipyrin) und Irgapyrin (Kombinationsprodukt von je 15 % Dimethylaminoantipyrin und Dioxydiphenylbutylpyrazol Natrium) gehemmten Leberhomogenaten die Wirkung von 2 Vitaminen, einem Proferment und einer Aminosäure untersucht. Es handelt sich

- 1) um Vitamin B₁ (aneurin)
- 2) um das phosphorylierte Vitamin B₁ (Cocarboxylase)
- 3) um das Vitamin B₁₂ und
- 4) um die Pantothensäure.

Die Verwendung gerade dieser Verbindungen wird in der Diskussion erläutert.

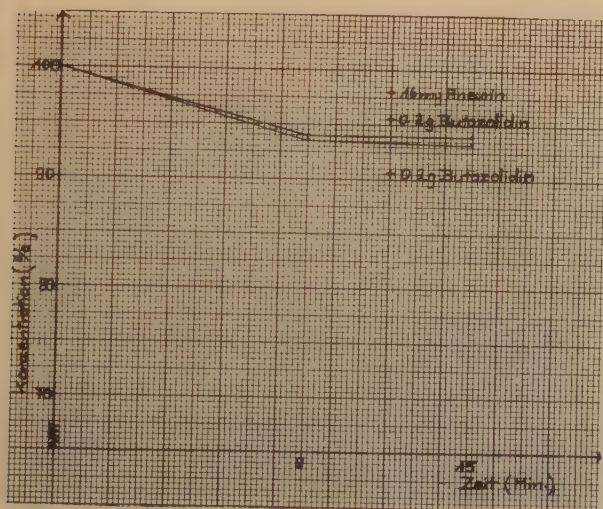
1) Versuche mit Butazolidin, Aminopyrin, Irgapyrin und Aneurin.

=====

Die Tabelle 1 zeigt zusammen mit der Abbildung 1 die Wirkung von Aneurin (Vitamin B₁) auf den durch Butazolidin gehemmten Fruktoseumsatz. Es wird ersichtlich, dass die Hemmwirkung des Butazolidin durch Aneurin nicht aufgehoben werden kann.

Abbildung 1.

Relativer Fruktoseabbau durch Leberhomogenat unter
Butazolidin und Aneurin.



Die jeweils verwendeten Konzentrationen von Butazolidin betragen 200 mg%. Ihnen steht eine Aneurinkonzentration von 16 mg% gegenüber.

Tabelle 1 .

Mittelwerte der Versuche				
Versuchsansätze		t (Minuten)		
		0	9	15
A	0,2 g Butazolidin	35,0	32,8	32,6
	0,2 g Butazolidin 16,0 mg Aneurin	34,6	32,5	32,5
B	0,2 g Butazolidin	100,0	93,8	93,4
	0,2 g Butazolidin 16,0 mg Aneurin	100,0	94,0	94,0

Erläuterung: Die Mittelwerte basieren auf jeweils 5 Parallelversuchen.

Die Tabelle 2 und die Abbildung 2 zeigen die Wirkung des Aneurin auf die Fähigkeit des Leberhomogenates DPN-H₂ zu oxydieren. Auch hier kann das Aneurin die Hemmwirkung des Butazolidin nicht aufheben. Das bedeutet , dass die Oxydationsfähigkeit des Homogenates wesentlich unter der normalen liegt (siehe Dissertation Hammerschm

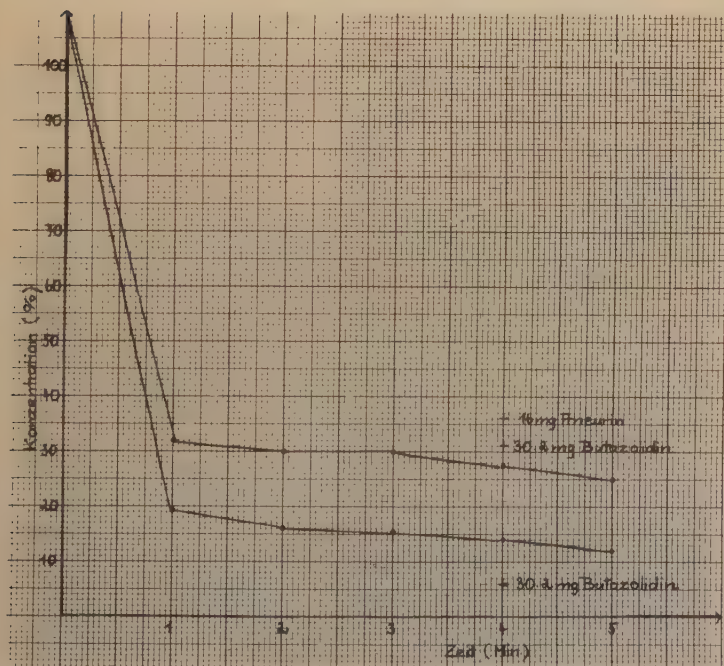
Tabelle 2 .

DPN-H ₂ Oxydation im Leberhomogenat unter Einfluss von Butazolidin und Aneurin							
Versuchsansätze		t (Minuten)					
		0	1	2	3	4	
A	30,2 mg But.	9,8	1,7	1,6	1,5	1,4	
	30,2 mg But. 16,0 mg Aneur.	9,8	3,1	2,9	2,9	2,7	
B	30,2 mg But.	100,0	19,1	16,0	15,6	14,0	1
	30,2 mg But. 16,0 mg Aneur.	100,0	32,0	30,0	30,0	27,5	2

Erläuterung: Die angeführten Mengen von Butazolidin und Aneurin wurden zu jeweils 100 ccm Trap-Pufferlösung gegeben. Unter A sind die absoluten Werte, unter B die relativen Werte angegeben.

Abbildung 2.

Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂ unter But - azolidin und Aneurin .



2) Versuche mit Butazolidin, Aminopyrin, Irgapyrin und Cocarboxylase.

= = = = =

Parallel den Versuchen, die unter Abschnitt 1 für Aneurin beschrieben worden sind, stellt der Abschnitt 2 Versuchsreihen dar, die sich mit der Wirkung von Cocarboxylase auf den durch Butazolidin, Aminopyrin und Irgapyrin gehemmten Abbau der Fruktose bzw. der gehemmten DPN-H₂ Oxydation befassen. Die Tabellen 3 und 4, sowie die Abbildungen 3 und 4 weisen zunächst nach, dass durch Cocarboxylase die Hemmwirkung des Butazolidin sowohl, wie des Irgapyrin aufgehoben werden kann. Das betrifft im speziellen Fall zunächst nur den Umsatz von Fruktose. Die für die einzelnen Versuche verwendeten Konzentrationen an Butazolidin, Irgapyrin und an Cocarboxylase sind den Tabellen zu entnehmen.

Analog der Aufhebung der Hemmwirkung bezüglich des Umsatzes von Fruktose, gelingt es durch Cocarboxylase auch die gehemmte Oxydation des DPN-H₂ wieder in Gang zu bringen. Diesen Tatbestand weisen die Tabellen 5 und 6, sowie die Abbildungen 5 und 6 nach. In den Abbildungen ist der Umsatz einer Reihe von Leberhomogenaten unter Butazolidin (16 mg%) und unter Butazolidin + Cocarboxylase verglichen. Es wird deutlich, dass die unter Zusatz von Cocarboxylase arbeitenden Leberhomogenate das DPN-H₂ wesentlich schneller zu oxydieren vermögen, als die Kontrollen. Dies trotz der Hemmung durch Butazolidin in einer Konzentration von 16 mg%. Das bedeutet, dass die 12,5 mg%ige Cocarboxylasekonzentration den durch Butazolidin gehemmten DPN-H₂ Umsatz auszugleichen vermag.

Andere Versuchsreihen wurden für Irgapyrin, sowie für Aminopyrin durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen den obigen Darstellungen.

Tabelle 3.

Mittelwerte der Versuche				
Versuchsansätze		t (Minuten)		
		0	9	15
A	0,2 g But.	34,2	32,2	32,2
	0,2 g But. 12,5 mg Cocarb.	33,4	31,8	25,2
B	0,2 g But.	100,0	94,2	94,2
	0,2 g But. 12,5 mg Cocarb.	100,0	95,3	75,5

Erläuterung: Die Mittelwerte basieren auf jeweils 5 Parallelversuchen.

Abbildung 3 .

Relativer Fruktoseabbau durch Leberhomogenat unter
B utazolidin und Cocarboxylase.

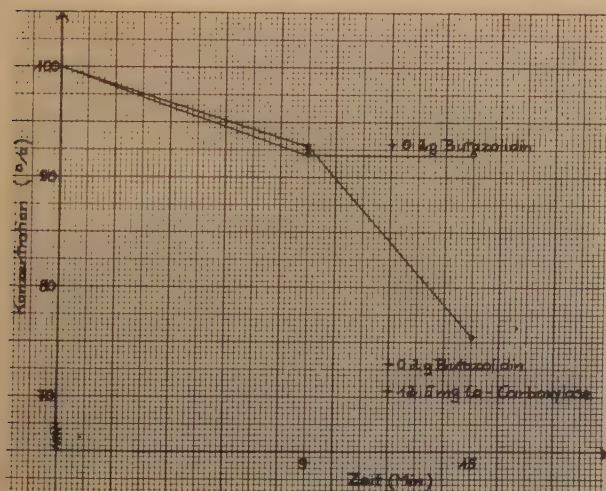


Tabelle 4 .

Mittelwerte der Versuche				
Versuchsansätze		t (Minuten)		
		0	9	15
A	0,3 g Irg.	33,0	33,0	32,0
	0,3 g Irg.	33,2	30,2	29,0
	12,5 mg Cocarb			
B	0,3 g Irg.	100,0	100,0	97,0
	0,3 g Irg.	100,0	91,0	87,4
	12,5 mg Cocarb			

Erläuterung: Die Mittelwerte basieren auf jeweils 5 Parallelversuchen.

Abbildung 4 .

Relativer Fruktoseabbau durch Leberhomogenat unter Irgapyrin und Cocarboxylase.

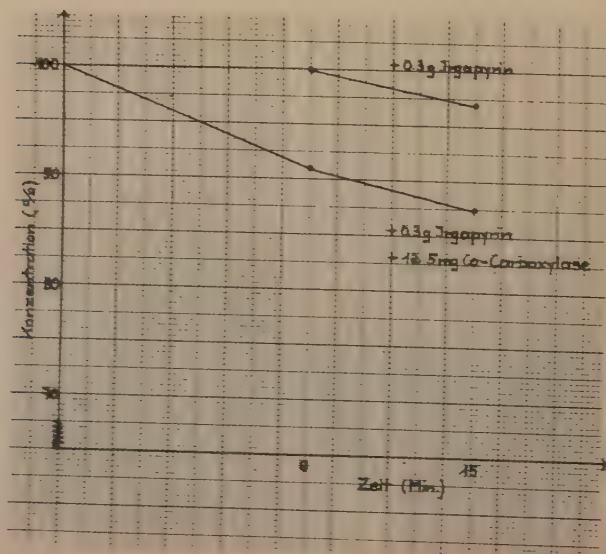


Tabelle 5 .

DPN-H ₂ Oxydation im Leberhomogenat unter Einfluss von Butazolidin und Cocarboxylase							
Versuchsansatz		t (Minuten)					
		0	1	2	3	4	5
A	16,0 mg Butazol.	10,0	6,3	4,8	4,1	3,5	2,8
	16,0 mg Butazol. 12,5 mg Cocarb.	10,0	3,4	1,9	0,5	0	0
B	16,0 mg Butazol.	100,0	62,7	48,0	41,2	35,2	27,8
	16,0 mg Butazol. 12,5 mg Cocarb.	100,0	34,0	19,2	4,7	0	0

Erläuterung: Die angeführten Mengen von Butazolidin und Cocarboxylase wurden zu jeweils 100 ccm Trap-Pufferlsg. gegeben.

Unter A sind die absoluten Werte,
unter B die relativen Werte angegeben

Abbildung 5.

Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂ unter Butazolidin und Cocarboxylase.

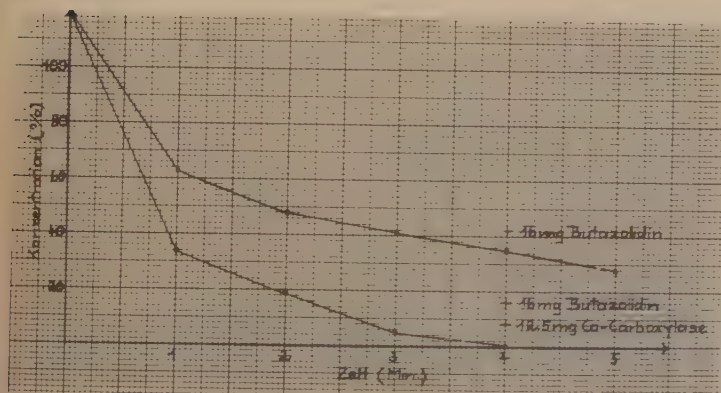


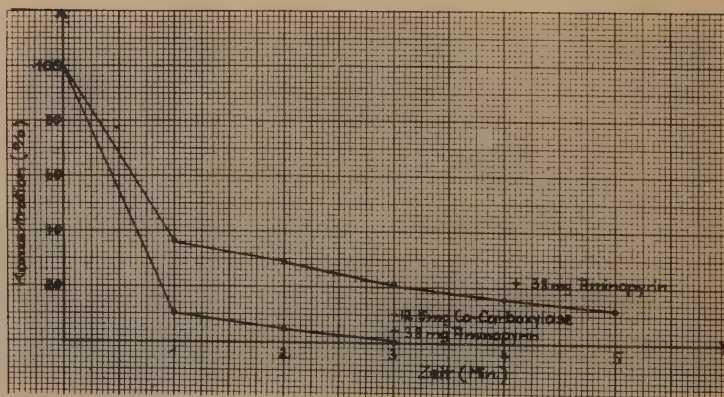
Tabelle 6 .

DPN-H ₂ Oxydation im Leberhomogenat unter Einfluss von Aminopyrin und Cocarboxylase							
Versuchsansätze		t (Minuten)					
		0	1	2	3	4	5
A	38 mg Aminopyrin	17,3	6,5	5,2	3,7	2,8	2,0
	38 mg Aminopyrin 12,5 mg Cocarb.	18,0	1,9	0,8	0	0	0
B	38 mg Aminopyrin	100,0	36,3	29,1	20,9	15,9	12,0
	38 mg Aminopyrin 12,5 mg Cocarb.	100,0	10,6	4,4	0	0	0

Erläuterung: Die angegebenen Mengen von Aminopyrin und Cocarboxylase wurden zu jeweils 100 ccm Trap-Pufferlösung gegeben.

Abbildung 6 .

Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂ unter
Aminopyrin und Cocarboxylase.



3) Versuche mit Butazolidin, Aminopyrin und
Vitamin B₁₂ .

=====

Die Tabellen 7 - 10 und die ihnen zugeordneten Abbildungen 7 - 10 untersuchen unter den gleichen Versuchsbedingungen den Einfluss von Vitamin B₁₂ auf den gehemmten Umsatz von Fruktose bzw. von DPN-H₂ durch Leberhomogenat. Die Hemmwirkung wurde ähnlich dem Vorgehen in Abschnitt 1 und 2 durch Butazolidin, bzw. Aminopyrin erhalten. Es zeigt sich, dass durch Vitamin B₁₂ ebenfalls eine Aufhebung der Hemmwirkung zu erreichen ist.

Die Tabellen erläutern sich dabei hinsichtlich der einzelnen experimentellen Bedingungen von selbst.

Bei den Versuchen mit Vitamin B₁₂ ist jedoch darauf hinzuweisen, dass eine Alterung des Vitamin B₁₂ - Präparates die Aufhebung des Vitamin B₁₂ - Effektes bedeutet. Präparate, die ca. 10 Minuten vor Versuchsbeginn hergestellt worden sind, zeigten bereits eine wesentliche Minderung ihrer Fähigkeit, den gehemmten Fruktoseumsatz sowohl, wie die gehemmte Oxydation des DPN-H₂ zu normalisieren.

Die Ursache dieses Phänomens kann hier zunächst nicht diskutiert werden.

Tabelle 7.

Mittelwerte der Versuche				
Versuchsansätze		t (Minuten)		
		0	9	15
A	0,2 g But.	37,6	35,0	35,8
	0,2 g But. 30 γ Vit. B ₁₂	35,6	33,8	27,0
B	0,2 g But.	100,0	93,3	95,4
	0,2 g But. 30 gamma B ₁₂	100,0	95,0	76,1

Erläuterung: Die Mittelwerte basieren auf jeweils 5 Parallelversuchen.

Die angeführten Mengen von Butazolidin und Vitamin B₁₂ wurden zu je 100 ccm Ringerlösung gegeben.

Abbildung 7 .

Relativer Fruktoseabbau durch Leberhomogenat unter Butazolidin und Vitamin B₁₂.

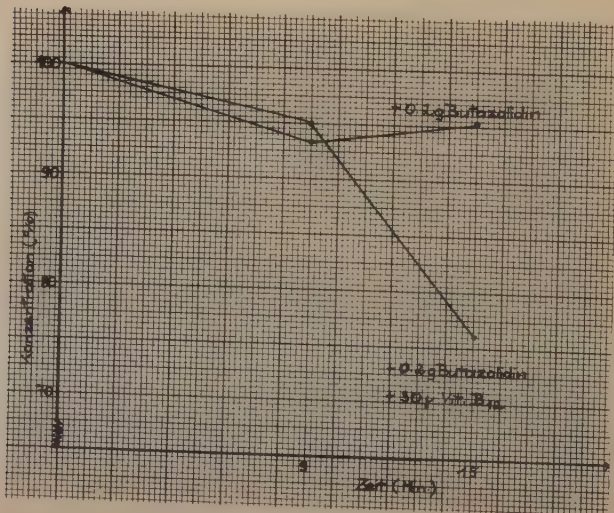


Tabelle 8 .

Mittelwerte der Versuche				
Versuchsansätze		t (Minuten)		
		0	9	15
A	0,2 g Aminopyr.	34,8	34,0	-
	0,2 g Aminopyr. 30 μ Vit.B ₁₂	35,0	29,0	-
B	0,2 g Aminopyr.	100,0	98,0	-
	0,2 g Aminopyr. 30 μ Vit.B ₁₂	100,0	83,0	-

Erläuterung: Die Mittelwerte basieren auf jeweils 4 Parallelversuchen.

Die angeführten Mengen von Aminopyrin und B₁₂ wurden zu je 100 ccm Ringerlösung gegeben.

Abbildung 8 .

Relativer Fruktoseabbau durch Leberhomogenat
unter Aminopyrin und Vit.B₁₂ .

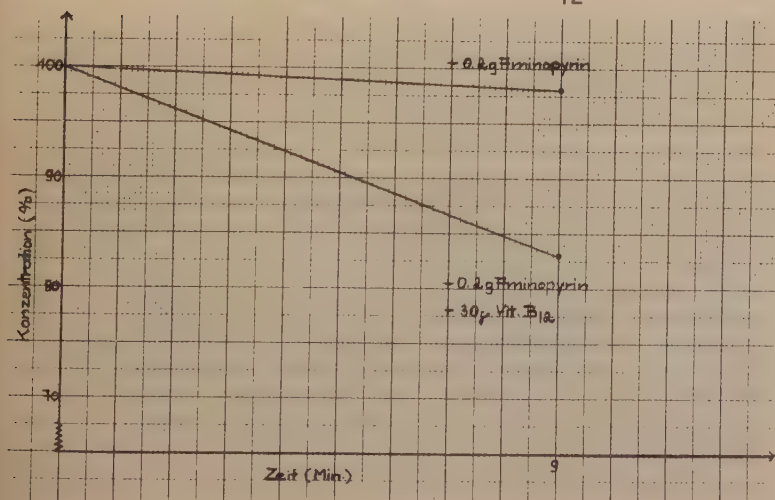


Tabelle 9 .

DPN-H ₂ Oxydation im Leberhomogenat unter Einfluss von Butazolidin und Vitamin B ₁₂							
Versuchsansätze		t (Minuten)					
		0	1	2	3	4	5
A	30 mg Butazolidin	23,4	15,7	15,3	14,9	14,7	14,5
	30mg Butazolidin 500 γ Vit. B ₁₂	18,2	5,4	5,3	5,3	5,1	5,0
B	30 mg Butazolidin	100,0	67,0	65,5	64,0	63,0	62,
	30 mg Butazolidin 500 γ Vit. B ₁₂	100,0	29,9	29,3	29,3	28,1	27,

Erläuterung: Die angeführten Mengen von Butazolidin und Vitamin B₁₂ wurden jeweils zu 100 ccm Trap-Pufferlösung gegeben.

Abbildung 9 .

Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂ unter Butazolidin und Vitamin B₁₂ .

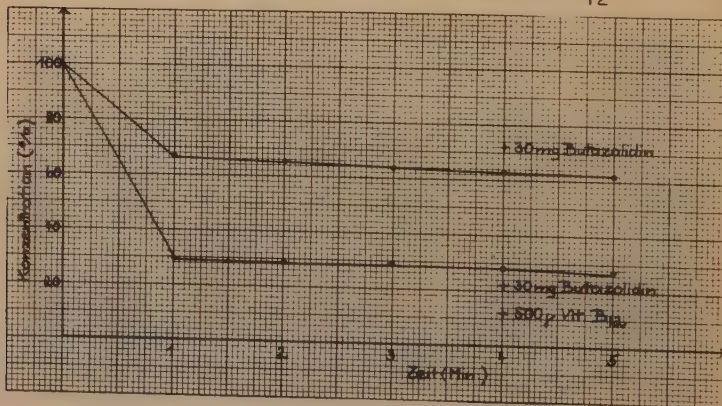


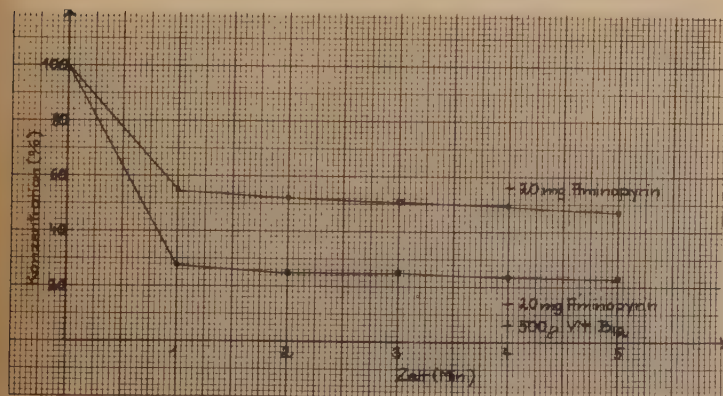
Tabelle 10 .

DPN-H ₂ Oxydation im Leberhomogenat unter Einfluss von Aminopyrin und Vitamin B ₁₂							
Versuchsansätze		t (Minuten)					
		0	1	2	3	4	5
A	20 mg Aminopyrin	15,5	8,4	8,1	7,9	7,7	7,3
	20 mg Aminopyrin 500 γ Vit. B ₁₂	15,5	4,3	3,9	3,9	3,7	3,5
B	20 mg Aminopyrin	100,0	54,3	52,2	51,0	49,5	47,1
	20 mg Aminopyrin 500 γ Vit. B ₁₂	100,0	27,8	25,2	25,2	23,8	22,6

Erläuterung: Die angeführten Mengen von Aminopyrin und Vitamin B₁₂ wurden jeweils zu 100 ccm Trap-Pufferlösung gegeben.

Abbildung 10 .

Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂ unter
Aminopyrin und Vitamin B₁₂ .



4) Versuche mit Butazolidin und Pantothersäure .

= = = = =

Die Tabellen 11 und 12 und die ihnen zugeordneten Abbildungen 11 und 12 untersuchen unter den gleichen Versuchsbedingungen den Einfluss von Pantothersäure auf den gehemmten Umsatz von Fruktose bzw. von DPN-H₂ durch Leberhomogenat. Die Hemmwirkung wurde ähnlich dem Vorgehen in den Abschnitten 1 - 3 durch Butazolidin erhalten. Es zeigt sich, dass die Hemmwirkung des Butazolidin durch Pantothersäure nicht aufgehoben werden kann.

Die jeweils verwendeten Konzentrationen von Butazolidin betrugen 200 mg%. Ihnen steht eine Pantothersäurekonzentration von 12,5 mg% gegenüber.

Tabelle 11.

Mittelwerte der Versuche			
Versuchsansätze		t (Minuten)	
		0	9
A	0,2 g Butazolidin	30,4	27,6
	0,2 g Butazolidin 12,5 mg Pantothersr.Ca.	33,2	30,8
B	0,2 g Butazolidin	100,0	91,0
	0,2 g Butazolidin 12,5 mg Pantothersr.Ca.	100,0	92,8

Erläuterung: Die Mittelwerte basieren auf jeweils 5 Parallelversuchen. Die angeführten Mengen von Butazolidin und Pantothersäure wurden zu je 100 ccm Ringerlösung gegeben.

Abbildung 11 .

Relativer Fruktoseabbau durch Leberhomogenat
unter Butazolidin und Pantothen-saurem Ca.

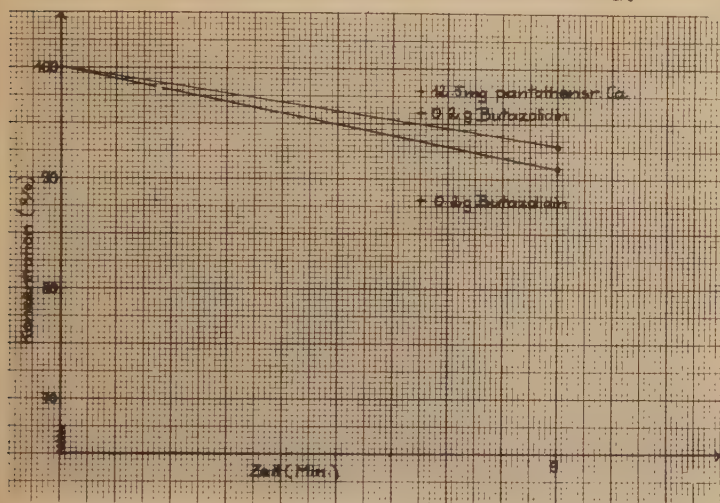


Tabelle 12 .

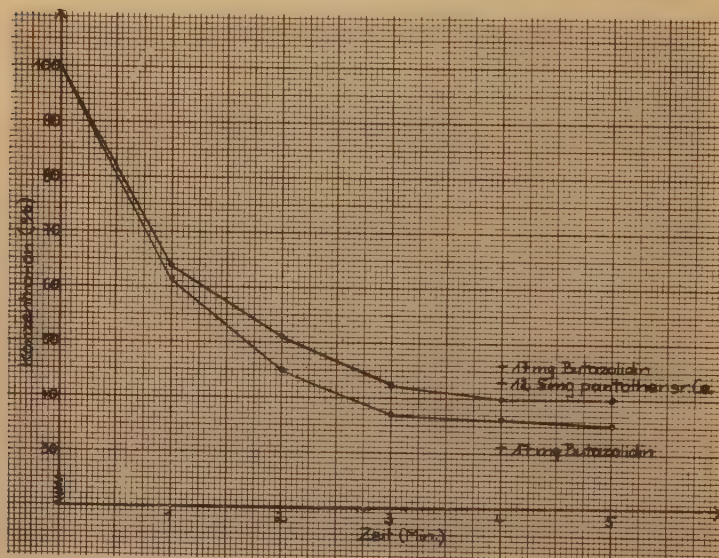
Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂ unter
Butazolidin und Pantothen-saurem Calcium

Versuchsansätze		t (Minuten)					
		0	1	2	3	4	5
A	17,0 mg Butazolidin	16,0	9,8	7,2	5,9	5,8	5,6
	17,0 mg Butazolidin 12,5 mg Pantothen-saure Ca	10,6	6,8	5,4	4,5	4,2	4,2
B	17,0 mg Butazolidin	100,0	61,4	45,0	37,0	36,2	35,1
	17,0 mg Butazolidin 12,5 mg Pantothen-saure Ca	100,0	64,0	51,1	42,1	40,0	40,0

Erläuterung: Die angeführten Mengen von Butazolidin und Pantothen-säure wurden zu jeweils 100 ccm Trap-Puffer-lösung gegeben.

Abbildung 12.

Relative Oxydationsgeschwindigkeit von DPN-H₂
unter Butazolidin und Pantothen-saurem Calcium.



Z u s a m m e n f a s s u n g .

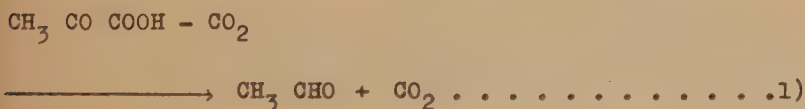
Die in den Abschnitten 1 - 4 dargestellten Untersuchungsergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass Co-carboxylase und Vitamin B₁₂ sowohl den durch Butazolidin, Aminopyrin und Irgapyrin gehemmten Fruktoseumsatz zu normalisieren vermögen, wie die Fähigkeit des Homogenates hydriertes DPN zu oxydieren, wieder herstellen. Die Untersuchungen enthalten allerdings noch keine Angaben über etwaiges stöchiometrisches Verhalten der Antagonisten.

Aneurin, d.h. die Vorstufe der Cocarboxylase, sowie die Pantothen-säure zeigen das Verhalten der beiden anderen enthemmenden Substanzen nicht. Mit ihnen kann die Hemmwirkung nicht aufgehoben werden.

III. D I S K U S S I O N .

= = = = =

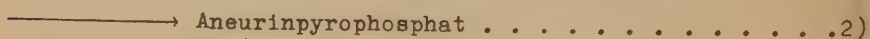
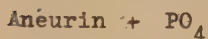
Die Diskussion muss von der Tatsache ausgehen, dass C o c a r b o x y l a s e , nicht aber Aneurin die durch Butazolidin und Aminopyrin hervorgerufene Hemmung des Kohlenhydratumsatzes und der DPN-H₂ Oxydation von Leberhomogenat aufhebt. Die Cocarboxylase ist ein Ferment, das den zu BTS abgebauten Zucker (Fruktose oder Glukose) decarboxyliert, das heisst die Reaktion



katalysiert (7).

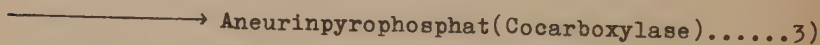
Das entstandene freie Azetyl wird anschliessend an einen Pantothersäureabkömmling gekoppelt. So entsteht aktivierte Essigsäure (8). Sie erst kann das gekoppelte Azetylradikal auf Oxalessigsäure übertragen. Es entsteht Zitronensäure. Mit diesem Schritt ist der aerobe Umsatz der Kohlenhydrate eingeleitet und das Energiereservoir

der Kohlenhydrate erst eigentlich erschlossen. Dadurch aber wird die Erzeugung von überschüssiger ATP sowohl, wie die Neubildung von hydriertem DPN möglich. Die entscheidende Tatsache, die sich aus den Versuchsreihen ergibt, ist die Aufhebung der Hemmung durch Cocarboxylase, nicht aber durch Aneurin. Deswegen muss angenommen werden, dass die durch Pyrazolone hervorgerufene Blockade bei dem Schritt



1 liegt. Das bedeutet also, dass die Übertragung von Phosphat auf das Vitamin gestört ist und damit die Bildung des Profermentes unmöglich gemacht wird. Ohne Cocarboxylase aber ist der aerobe Umsatz von Hexosen und ihrer Spaltstücke nicht möglich, da die BTS am Eingang des Zitronensäurezyklus liegt. Diese Zwischenstufe muss passiert werden.

Untersucht man nun die Bruttogleichung 2) näher, so wird deutlich, dass bei dem sicher endothermen Vorgang der Aneurinpyrophosphatbildung ein wesentlich komplizierteres System mithelfen muss, um dem Aneurin die Phosphatgruppe zuzuführen. Am plausibelsten ist der in Gleichung 3) gegebene Ansatz, nämlich



Unter den Voraussetzungen der Gleichung 3) muss sowohl eine Minderung der Anlieferung von ATP, wie das Fehlen des Fermentes, nämlich der Transphosphorylase, die Aneurinpyrophosphatbildung zum Erliegen bringen. Die Beobachtung,

dass nach Zusatz von Pyrazolonen zum Substrat keine Cocarboxylase mehr entsteht, kann also sowohl durch die Annahme erklärt werden, dass energiereiches Phosphat, nämlich ATP fehlt, als durch die Annahme, dass die Transphosphorylasen nicht mehr gebildet werden. Denn die Arbeit konnte zunächst nur den Beweis liefern, dass Cocarboxylase nicht angebildet wird.

Zur Zeit der Entstehung der Arbeit waren Versuche mit ATP nicht möglich, da die Substanz nicht greifbar war. Der schlüssige Beweis, dass ein ATP-Mangel die Bildung des Aneurinpyrophosphat verhindert hat, steht deswegen noch aus. Die Versuchsreihen mit Vitamin B₁₂ können jedoch die Vermutung nahe legen, dass der Mangel von ATP der ausschlaggebende Faktor, der die Aneurinpyrophosphatbildung verhindert, nicht sein kann. Denn Vitamin B₁₂ greift sicher nur indirekt in den Umsatz der energiereichen Phosphate ein. Eine Reihe von Autoren bringen Vitamin B₁₂ direkt mit den Fermenten in Zusammenhang, die vor allem den Umsatz von ATP katalysieren. Vitamin B₁₂ scheint deswegen in der Anbildung der Transphosphorylasen ein notwendiger Faktor zu sein. Unter Hinzunahme dieser Tatsache ist der Schluss wahrscheinlich, dass die untersuchten Pyrazolone eine Hemmung des Transphosphorylasesystems bewirken. Für diese Tatsache spricht weiterhin der Umstand, dass eine essentielle Aminosäure, die wesentlich am Aufbau der aktivierten Essigsäure beteiligt ist, keine Wirkung bezüglich der Hemmungsaufhebung hatte. Eine Hemmung der Bildung der aktivierten Essigsäure als Ursache der biochemischen Wirkung der Pyrazolone ist deswegen zunächst nicht sehr wahrscheinlich.

Nachdem der Nachweis einer Hemmwirkung der Pyrazolone auf den Kohlenhydratstoffwechsel von Leberhomogenaten überhaupt erfolgt war, hat die Arbeit das Problem dieser Hemmwirkung eingeengt. Das durch Pyrazolone blockierte

Schlüsselferment ist wahrscheinlich das Transphosphorylase-System. Das genügt, um die beobachtete Hemmung (Fruktoseumsatz, wie DPN-H₂ Oxydation) zu erklären. Denn mit der Tatsache, dass die Decarboxylierung der BTS unmöglich wird, erlischt der oxydative Umsatz der Kohlenhydrate überhaupt. Eine Umsatzsystem, wie das der Kohlenhydrate, das eine Fermentkette darstellt, muss in seiner Aktivität erliegen, wenn nur eines der die Kette aufbauenden Fermente blockiert wird. Es bleibt dahingestellt, ob die vermutete Hemmung des Transphosphorylasesystems die einzige Wirkung der Pyrazolone auf den Kohlenhydratstoffwechsel des Gewebes ist. Auch sind die Einzelheiten des Hemm-Mechanismus aus den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen noch nicht zu erschliessen. Deswegen sei darauf hingewiesen, dass die vorgelegten Untersuchungsreihen lediglich der Anfang einer Reihe weiterer Untersuchungen sein können, die sich mit dem Problem der Konstitution und Wirkung der Pyrazolone weiter auseinander setzen müssen.

IV. A N H A N G .

= = = = =

Da s bei den Versuchen verwandte Leberhomogenat wird wie folgt hergestellt:

Die warm entnommene und zur Konservierung auf - 20 C abgekühlte Leber von Schweinen oder Kälbern wird mit Ringerlösung im Verhältnis 2 : 1 im Multimix zerkleinert und durch ein Haarsieb gestrichen. Es erweist sich als notwendig, das Homogenat kurz vor jedem Versuch zu bereiten, da eine Alterung die Fermentaktivität in kurzer Zeit (20 Minuten) aufhebt.

Die Reaktion läuft mit 5 ccm des Homogenates bei 37 Grad Celsius in 100 ml Ringerlösung der nachstehend gegebenen Zusammensetzung ab.

Tabelle 1 .

Säugetier - Ringerlösung.

NaCl		9,00 g
KCl		0,42 g
CaCl ₂		0,24 g
NaHCO ₃		0,50 g
Fruktose		0,50 g
MgCl ₂		0,025g
H ₂ O	ad	1000,00 g

Nach den in den Tabellen spezifizierten Zeiten erfolgen die Entnahmen zur Analyse. Zur Unterbrechung der Fermentationreaktion werden die dem Brutschrank entnommenen Proben sofort in tiefgekühlte Spitzgläschen verbracht und die Fruktosebestimmungen unmittelbar durchgeführt.

Der Fruktosegehalt wird nach dem Verfahren nach MARTIN bestimmt. (9).

Bei Verwendung des DPN- H_2 Systems sind die Versuchsbedingungen etwas modifiziert. An die Stelle der Ringer-Lösung tritt eine Trap-Pufferlösung mit folgender Zusammensetzung:

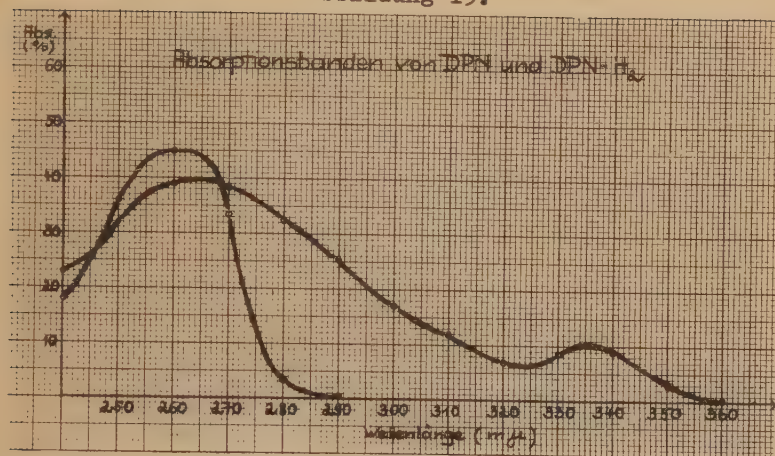
Tabelle 2 .

NaCl	9,00 g
KCl	0,42 g
CaCl ₂	0,24 g
NaHCO ₃	0,50 g
Fruktose	0,80 g
MgCl ₂	0,25 g
Triäthanolamin (Trap)	14,90 g

Phosphatpuffer nach SÖRENSEN zur Einstellung von pH 7. Da das Triäthanolamin in der angenähert n/10 molaren Lösung, in der es vorliegt, einen pH von 8,0 aufweist, muss die Gesamtlösung mit n/10 HCl auf pH 7,0 nachgestellt werden. Die Lösung wird sterilisiert und im Thermostaten bei 37 Grad Celsius aufbewahrt.

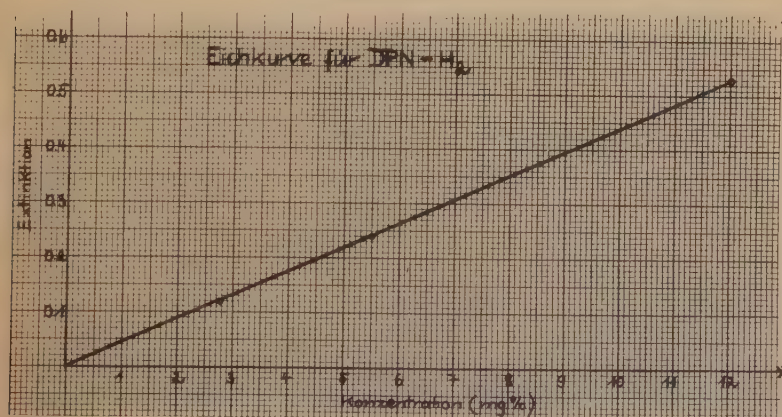
Für die Herstellung des Homogenates wird eine Trap-Pufferlösung ohne Fruktosezusatz verwendet und zwar wieder im Verhältnis Leber-Frischgewicht : Trap-Pufferlösung = 2 : 1 . Die Oxydationsvorgänge im DPN- H_2 System werden am Spektralphotometer abgelesen. Die Absorptionsbande des reduzierten Co-I (DPN- H_2) zeigt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 340 mμ (10).

Abbildung 13.



Durch die Oxydation des DPN-H₂ kommt es zum Verschwinden des Absorptionsmaximums bei 340 mμ. Bestimmt man die Extinctionsgrösse bekannter Konzentrationen, so kann man eine Eichkurve für DPN-H₂ aufstellen, die dem LAMPERT-BEERSchen Gesetz folgt.

Abbildung 14.



Im einzelnen wird der Versuch wie folgt durchgeführt:

Die Trap-Pufferlösung wird zunächst mit einer bestimmten Menge DPN-H₂ versetzt, davon werden 5 ccm in einer 10 mm - Quarzküvette nach Zugabe von 0,1 ccm Leberhomogenat gegen den Leerwert photometriert (absoluter Wert).

Für die Überlassung des Themas bin ich Herrn Prof.Dr.D.JAHN, Vorstand der I.Medizinischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg zu grossem Dank verpflichtet.

Für die tatkräftige und grosszügige Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten und für die wertvollen Anregungen schulde ich Herrn Dr. HILLER vielen Dank.

L e b e n s l a u f .

Am 14. Juni 1929 wurde ich als Sohn des Rechtsanwaltes Franz Xaver Kügler in Nürnberg geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Roth/Nbg. trat ich in die Oberschule für Jungen in Nürnberg, an der Wölckernstrasse ein. Vom November 1944 bis Kriegsende war ich eingezogen. Im Jahre 1948 legte ich an der Oberrealschule in Fürth/Bay. die Reifeprüfung ab. Das Studium der Medizin begann ich mit dem Wintersemester 1949/50. Im April 1952 legte ich nach dem 5. vorklinischen Semester an der Universität Erlangen die Ärztliche Vorprüfung ab. Auch während der folgenden Semester war ich an der Universität Erlangen immatrikuliert.

